

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-275140

(43)Date of publication of application : 07.10.2004

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

(21)Application number : 2003-074358

(71)Applicant : NATIONAL INSTITUTE OF
ADVANCED INDUSTRIAL &
TECHNOLOGY
UNIV KINKI
KITAKYUSHU FOUNDATION FOR
THE ADVANCEMENT OF INDUSTRY
SCIENCE & TECHNOLOGY

(22)Date of filing : 18.03.2003

(72)Inventor : FUJII MASAYUKI
OBA HIDEKI

(54) METHOD FOR PRODUCING DNA OR RNA CONJUGATE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing a new DNA or a RNA conjugate, free from restriction on the molecular species to be conjugated, enabling easy purification and causing little loss of the product.

SOLUTION: A DNA or RNA fragment is modified with an active hydrogen-containing group on a solid carrier and condensed with a functional organic compound having an active hydrogen-containing group through a bifunctional linker.

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-275140

(P2004-275140A)

(43) 公開日 平成16年10月7日 (2004. 10. 7)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

F 1

C 1 2 N 15/00

Z N A A

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2003-74358 (P2003-74358)

(22) 出願日 平成15年3月18日 (2003. 3. 18)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成14年9月18日 社団法人高分子学会発行の「高分子学会予稿集51巻 14号」に発表

(71) 出願人 301021533

独立行政法人産業技術総合研究所

東京都千代田区霞が関1-3-1

(71) 出願人 000125347

学校法人近畿大学

大阪府東大阪市小若江3丁目4番1号

(71) 出願人 802000031

財団法人北九州産業学術推進機構

福岡県北九州市若松区ひびきの2番1号

(74) 代理人 100071825

弁理士 阿形 明

(72) 発明者 藤井 政幸

福岡県飯塚市柏の森11-6 近畿大学九州工学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA又はRNAコンジュゲートの製造方法

(57) 【要約】

【課題】コンジュゲートしうる分子種に制限がなく、しかも精製が容易でプロダクツ損失が少ない新規なDNA又はRNAコンジュゲートの製造方法を提供する。

【解決手段】固相担体上においてDNA又はRNAのフラグメントを活性水素含有基で修飾し、これに二官能性リンカーを介して活性水素含有基をもつ機能性有機化合物を縮合させる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

固相担体上においてDNA又はRNAのフラグメントを活性水素含有基で修飾し、これに二官能性リンカーを介して活性水素含有基をもつ機能性有機化合物を縮合させることを特徴とするDNA又はRNAコンジュゲートの製造方法。

【請求項2】

活性水素含有基が、アミノ基、カルボキシル基、チオール基及びヒドロキシル基の中から選ばれた少なくとも1種である請求項1記載のDNA又はRNAコンジュゲートの製造方法。

【請求項3】

二官能性リンカーが、イソシアナト基、チオイソシアナト基、マレイミド基、カルボン酸活性エステル基、カルボキシル基、チオール基、ハロゲノアセチル基及びアミノ基の中から選ばれた少なくとも1種の基2個を有する化合物である請求項1又は2記載のDNA又はRNAコンジュゲートの製造方法。

【請求項4】

機能性有機化合物が、タンパク質、ペプチド、酵素、糖類、脂質及び蛍光色素の中から選ばれた少なくとも1種である請求項1、2又は3記載のDNA又はRNAコンジュゲートの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、固相担体上でDNA又はRNAのフラグメントと任意の機能性有機化合物とをリンカーを介して縮合させることにより、精製工程を少なくし、効率よくDNA又はRNAコンジュゲートを製造する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年、アンチセンス・アンチジーン法やリボザイム法により得られる遺伝子医薬が注目されているが、これらの遺伝子医薬については、膜透過性、ヌクレアーゼ耐性、特異性及び親和性について、いろいろな問題点がある。

そして、これらの問題点の多くは、オリゴヌクレオチドのリン酸骨格、糖部分、塩基部分に機能性ペプチドをコンジュゲートすることにより解決しうると考えられている。

【0003】

ところで、このペプチドをコンジュゲートする方法としては、液相中で α -マレイニミドブチルオキシサクシンイミドをリンカーとして用いる方法（非特許文献1参照）、液相中でヨードアセトキシサクシンイミドをリンカーとして用いる方法（非特許文献2参照）、緩衝液中でリンカーとDNAを結合させ、液相中でペプチドとコンジュゲートする方法（非特許文献3参照）などが知られているが、液相法は得られた生成物をクロマトグラフィーを用いて精製しなければならないため、操作が煩雑になるのを免れない。

【0004】

他方、固相法として、固相上で、まずペプチド合成を行い、次いでDNA-RNAを合成し、最後にアンモニア処理する方法が提案されているが（非特許文献4参照）、この方法ではペプチド中に組み込むことができるアミノ酸が制限されるという欠点がある。

【0005】

【非特許文献1】

「バイオコンジュゲート ケミストリー (Biocojugate Chem.)」, (米国), 第5巻, 1994年, p. 373-378

【非特許文献2】

「バイオコンジュゲート ケミストリー (Biocojugate Chem.)」, (米国), 第5巻, 1994年, p. 468-474

【非特許文献3】

「ザ・ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー(The Journal of Organic Chemistry)」, (米国), 第65巻, 第16号, 2000年, p. 4900-4908

【非特許文献4】

「テトラヘドロン・レターズ(Tetrahedron Letters,)」, (英国), 第35巻, 第17号, 1994年, p. 2733-2736

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような事情のもとで、従来方法のもつ欠点を克服し、コンジュゲートする分子種に制限がなく、しかも精製が容易でプロダクツ損失が少ない新規なDNA又はRNAコンジュゲートの製造方法を提供することを目的としてなされたものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、DNA又はRNAコンジュゲートを製造する方法について鋭意研究を重ねた結果、固相担体上においてDNA又はRNAのフラグメントを修飾し、それに二官能性リンカーを介して機能性有機化合物を縮合させることにより、縮合させる分子種の制限なしに、しかも純度の高いDNA又はRNAコンジュゲートを得ることができることを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。

【0008】

すなわち、本発明は、固相担体上においてDNA又はRNAのフラグメントを活性水素含有基で修飾し、これに二官能性リンカーを介して活性水素含有基をもつ機能性有機化合物を縮合させることを特徴とするDNA又はRNAコンジュゲートの製造方法を提供するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明方法においては、固相担体上で処理することが必要であるが、この固相担体としては、例えば多孔性ガラス、制御多孔性ガラス(CPG)、ポリエチレングリコール-ポリスチレンなどが用いられる。

【0010】

この固相担体上で、例えば汎用されているシアノエチルアミダイト法のプロトコルに従い、DNA又はRNAのフラグメントを自動合成したのち、得られたフラグメントの5'-末端又は中間の位置の水酸基を活性水素含有基で化学修飾する。この活性水素含有基としては、例えばアミノ基、カルボキシル基、チオール基及びヒドロキシル基を挙げることができる。この際、フラグメント合成で用いた塩基部とリン酸部の保護基は結合させたままで後続の反応に供することができる。

【0011】

次に、このようにして固相担体に担持されたままの化学修飾させたDNA又はRNAのフラグメントに二官能性リンカーを反応させ、フラグメントとリンカーとを結合させる。ここで用いる二官能性リンカーは、上記の活性水素含有基と反応して安定な結合を形成する官能基2個を有する化合物である。

【0012】

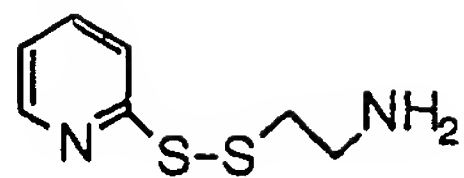
このような官能基としては、例えば、アミノ基と反応するものとして、イソシアナト基、チオイソシアナト基、カルボン酸活性エステル基、カルボキシル基などが、チオール基と反応するものとして、マレイミド基、チオール基やヨードアセチル基、ブromoアセチル基、クロロアセチル基のようなハロゲノアセチル基などが、またカルボキシル基と反応するものとして、イソシアナト基、アミノ基などがある。

【0013】

したがって、二官能性リンカーとしては、例えば以下の(イ)ないし(チ)に示す化合物がある。

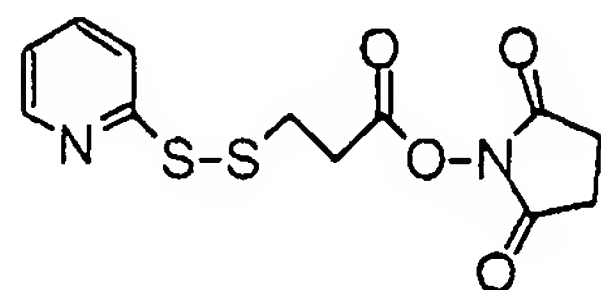
(イ) S-(2-ピリジルジチオ)システアミン

【化1】



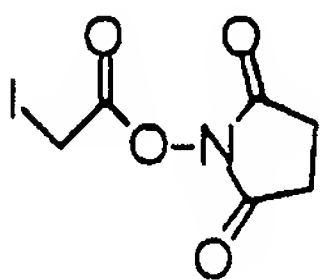
(ロ) N - スクシンイミジル = 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピナート

【化2】



(ハ) ヨードアセトキシスクシンイミド

【化3】



(ニ) ジチオイソシアナトアルカン

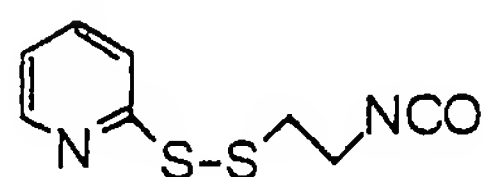
 $\text{SNC}-(\text{CH}_2)_n-\text{NCS}$

(ホ) ジイソシアナトアルカン

 $\text{ONC}-(\text{CH}_2)_n-\text{NCO}$ (ただし n は 1 ~ 10 の整数)

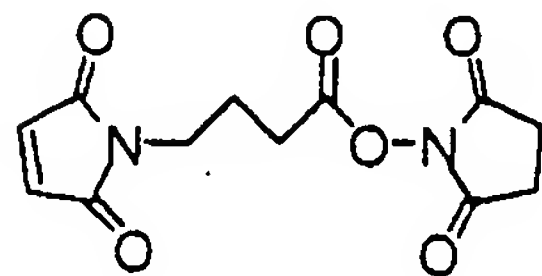
(ヘ) 2 - (2 - ピリジルジチオ) エチルイソシアネート

【化4】



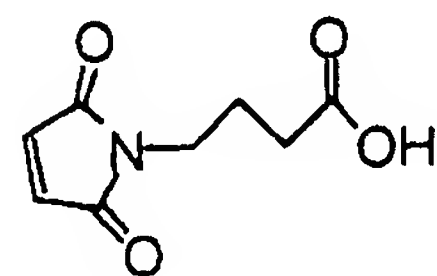
(ト) N - (4 - マレイミドブチリルオキシ) スクシンイミド

【化5】



(チ) N - 4 - マレイミド酪酸

【化6】



【0014】

このDNA又はRNAのフラグメントと二官能性リンカーとの反応は、前記の固相担体上で化学修飾されたDNA又はRNAのフラグメントに、上記の二官能性リンカーを、例えばアセトニトリルやジメチルホルムアミドのような溶液に溶かして加え、10～40℃において2～10時間かきまぜる。この際の溶液中の二官能性リンカーの濃度としては、0.1～1モル/リットルが好ましい。反応終了後、上記の溶剤でよく洗浄して不純物を除去する。

【0015】

次に、このようにして得たDNA又はRNAのフラグメントと二官能性リンカーとの縮合生成物を固相担体上に担持したまま、これに活性水素含有基、例えば水酸基、アミノ基、チオール基、カルボキシル基などをもつ機能性有機化合物を有機溶剤、例えばアセトニトリルやジメチルホルムアミドなどに溶解して加え、10～40℃において2～10時間かきまぜることによって反応させる。反応終了後、同じ溶剤で洗浄し、不純物を除くと固相担体に結合したDNA又はRNAコンジュゲートが得られる。

次いで、アルカリで処理し固相担体から脱離させ、クロマトグラフなどにより精製すれば、所望のDNA-RNAコンジュゲートが20～50%の収率で得られる。

【0016】

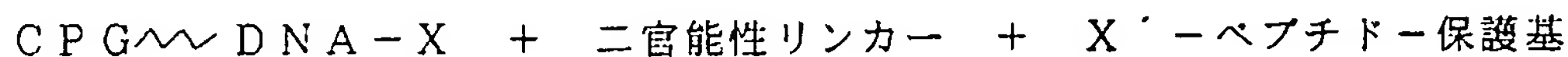
この際用いるアルカリとしては、濃アンモニア水又は0.5M炭酸ナトリウム水溶液が好ましい。

また、前記の機能性有機化合物の例には、DNA、RNA、ペプチド、タンパク質、酵素、糖類、脂質、ホルモン、蛍光色素、合成高分子などがある。

【0017】

以下に、各種の二官能性リンカーを用いて、DNAとペプチドとをコンジュゲートさせる方法を例として本発明方法の反応式を示す。

【化7】



固相フラグメント縮合



アルカリ処理



(式中のX及びX'は、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SH}$ 又は $-\text{OH}$ である)

【0018】

【実施例】

次に、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによりなんら限定されるものではない。

【0019】

実施例1

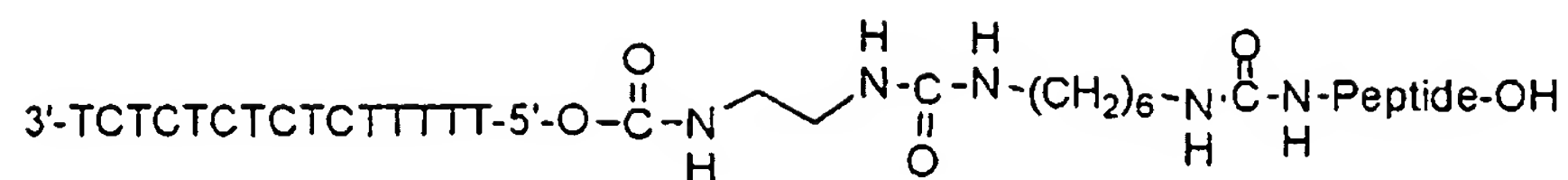
DNA自動合成機(クアケム社製、製品名「PS250」)を用い、常法に従いCPG担体上でオリゴヌクレオチドの5'末端をアミノ基で化学修飾した。

次いで、ヘキサメチレンジイソシアナートをアセトニトリルに溶かして調製した0.5モル濃度溶液を加え、20℃において5時間反応させたのち、アミノ酸側鎖を保護したフリーのN末端アミノ基をもつペプチドフラグメントを反応させることにより、オリゴヌクレオチドの5'末端にヘキサメチレンジイソシアナートを介してペプチドを結合させた。

次に、この反応生成物に28%濃度のアンモニア水を加え、55℃において5時間かきまぜることにより、固相担体からの生成コンジュゲートの切り出しと同時にペプチドからの保護基の脱離を行った。

このようにして、式

【化8】



で表わされるDNAフラグメントとペプチドとのコンジュゲートが収率25%で得られた。

【0020】

実施例2

実施例1と同様にしてCPG上においてヒト免疫不全ウイルス(HIV)Revタンパク質由来のペプチドを合成し、その5'末端のDMTを脱保護し、アミノ化試薬を反応させてアミノ基を導入した。

次いで、ヘキサメチレンジイソシアネートを加えて室温で12時間反応させたのち、核外輸送シグナルペプチド(F1-NESペプチド)を加え、45℃において24時間反応させ、最後にアンモニア水を加えて55℃において4時間反応させるとことによりCPGから切り出した。

このようにして、DNA-NESペプチドコンジュゲートを得た。

【0021】

実施例3

F_m。固相合成法により、アミノ基を5'末端にオリゴヌクレオチドを製造した。

次いで、N-(4-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミドを加えて、オリゴヌクレオチドのアミノ基と結合させた。

次に同様にF_m。固相合成法によりN末端にシスチン残基をもつペプチドを製造し、シスチン残基のチオール基とオリゴヌクレオチドのマレイミド基を反応させることにより、DNA-ペプチドコンジュゲートを収率35%で得た。

【0022】

【発明の効果】

本発明によれば、DNA又はRNAのフラグメントに多種多様の機能性有機化合物の分子を、簡単かつ高効率でコンジュゲートさせることができるため、DNAやRNA分子に種々の機能を付与することができ、例えば、分解酵素に対して耐性を付与するDNA又はRNA分子、細胞内への取り込みを促進させるDNA又はRNA分子、反応性を向上させるDNA又はRNA触媒分子などを導入する手段として有望である。

(72)発明者 大庭 英樹

佐賀県鳥栖市宿町字野々下 8 0 7 番地 1 独立行政法人産業技術総合研究所九州センター内
Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 CA01 CA11